

論文内容要旨

間葉系幹細胞の *in vivo* および *ex vivo* 分化誘導を
併用した細胞治療の開発
—大規模歯周組織欠損再生への展開—

応用生命科学部門歯周病態学

(主指導教員：栗原 英見 教授)

応用生命科学部門口腔外科学

(副指導教員：武知 正晃 准教授)

応用生命科学部門歯周病態学

(副指導教員：柴 秀樹 准教授)

藤田 貴子

論 文 内 容 要 旨

間葉系幹細胞の *in vivo* および *ex vivo* 分化誘導を併用した細胞治療の開発 —大規模歯周組織欠損再生への展開—

学位申請者 藤田 貴子

歯周炎は歯周病原細菌とそれに対する免疫応答の結果、歯周組織の破壊が起こる感染症である。歯周組織の再生治療は、歯周炎の再発のリスクを低減することが可能で、結果的に全身疾患に対するリスクも低減することになる。現在サイトカインや細胞を用いた新しい歯周組織再生療法の研究・開発が進められている。サイトカインは品質が保証されており、大量生産が可能である。サイトカイン療法は内在性細胞の制御によって再生を促すため、小・中規模の欠損に適している。大規模欠損の再生には、細胞の不足を補える細胞治療が適していると考えられる。細胞治療は生体外で細胞を加工できるという大きな特徴を持っている。そのため、欠損部に増殖や分化を誘導した細胞を供給することができる。現時点では、倫理面・安全性の点から、間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた歯周組織再生療法が有用であると考えた。

これまでの基礎研究で、骨髄由来の MSCs をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の実験的歯周組織欠損に移植したところ、MSCs 移植群は対照のアテロコラーゲン群と比較してセメント質、歯槽骨再生が有意に促進した。しかし、一部の標本では分岐部直下にセメント質および歯周靭帯が再生したにも関わらず、骨の再生が不十分のものがあり、残存骨から離れた部位においては MSCs に対する骨分化刺激が不足していると考えられた。さらに大規模欠損では細胞を骨欠損部に維持することが困難であるため、適切な担体によって細胞を保持する必要がある。つまり、MSCs を *ex vivo* で骨分化誘導した後に、適切な担体と共に移植することで、大規模欠損においても骨を効率的に再生できるのではないかと考えた。

担体には、生体適合性、多孔性、成形性、生分解性が求められる。現在、歯周組織再生療法の担体としてアテロコラーゲン、ヒアルロン酸、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP などが研究されているが、本研究ではポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) の成形性に着目した。PLGA はパウダー、プレートやブロックに成形が可能で、生体内では加水分解で代謝される。今までドラッグデリバリーシステム、Guided Tissue Regeneration 用の膜や骨組織再生の分野で研究が行われている。今回ブロック状に成形された PLGA を担体として用いることで MSCs を三次元的に保持できると考えた。

以上のことから、セメント質・歯周靭帯再生を目的に未分化の MSCs を、そして骨再生を目的に PLGA を担体として *ex vivo* で骨分化誘導した MSCs を移植することで、大規模歯周組織欠損の再生が可能であると仮説を立てた。

別紙様式 2

本研究では、まず *ex vivo* においてヒト骨髄由来 MSCs を PLGA ブロック内で三次元的に培養するシステムを確立し、骨分化を誘導した。PLGA に播種した MSCs は培養 1 日目でブロック表面に接着・伸展することを走査型電子顕微鏡で観察した。また、コハク酸デヒドロゲナーゼ染色によって培養 14 日目のブロックの表面・内部で MSCs が生存していることを確認した。PLGA ブロック内部の細胞 DNA 量は 0 日、7 日、14 日で有意差はなかった。また、*real-time PCR* 法を用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) および *Core binding factor alfa1 mRNA* 発現、ALP 活性、アリザリンレッド染色およびマイクロ CT 撮影によって、PLGA ブロックに播種した MSCs は骨分化誘導培地で骨分化誘導されることを確認した。

次にビーグル犬の両側下顎第 3 小臼歯の近遠心および第 1 大臼歯の近心に深さと近遠心幅が 4 mm の炎症性の 1 壁性歯周組織欠損モデルを作製し、移植実験を行った。根表面はセメント質および歯周靭帯を再生させることを目的に、24 %EDTA で 30 秒間根面処理後、アテロコラーゲンゲルを担体として未分化の MSCs を移植した。また、移植体として A) PLGA ブロックのみ、B) PLGA ブロック + 未分化 MSCs、C) PLGA ブロック + 骨分化誘導した MSCs を用いた。移植から 6 週間経過観察後、灌流固定を行い、標本作製後、HE 染色を施して組織観察を行った。また脱灰前に欠損をマイクロ CT 撮影し、新生骨量を評価した。

すべての群において、欠損内部に PLGA ブロックが一部残存していたが、根表面にセメント質および歯周靭帯が再生しており、上皮の根尖側への侵入は認められなかった。既存の歯槽骨から骨様組織の再生が確認され、根面付近ではグループ A および B では底部ノッチ付近、グループ C では上部ノッチ付近まで骨が再生した。マイクロ CT 撮影から解析した欠損部に対する新生骨量は、グループ A、B、C でそれぞれ 10.9 ± 8.3 %、 13.3 ± 8.9 %、 23.6 ± 5.9 %で、グループ A と比較してグループ C で有意に骨が再生した。

今回の動物実験において、未分化の MSCs を移植し、生体内にてセメント質・歯周靭帯を再生することができた。骨分化誘導した MSCs を PLGA ブロックを担体として移植することによって、骨の再生を有意に促進することができた。本研究から、未分化 MSCs と *ex vivo* で分化誘導した MSCs を適切な担体を用いて移植することで、大規模歯周組織欠損を早期に、効率的に再生できる可能性が示唆された。